基于种特异性 COI 标记的新入侵种甘蓝粉虱快速鉴定技术

陈苗苗[1]，郭 荣[3]，张金良[4]，万方浩[1,2,5]，杨 锦[1]，张桂芬[1,2,*]

（1. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193；
2. 农业部外来入侵生物预防与控制研究中心，北京 100193；
3. 全国农业技术推广服务中心，北京 100026；4. 北京市植物保护站，北京 100029；
5. 青岛农业大学农学与植物保护学院，山东青岛 266109）

摘要：【目的】针对粉虱类害虫种类多、体型微小、形态相似、难以准确快速识别的问题，以新入侵我国大陆的甘蓝粉虱 *Aleyrodes proletella*（L.）为靶标，以田间常见的其他 10 种/隐种粉虱为参照，采用基于线粒体 DNA 细胞色素 C 氧化酶亚基 I（mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I, mtDNA COI）基因的种特异性（species-specific COI, SS-COI）PCR 方法，研究其快速分子检测技术。【方法】利用 mtDNA COI 基因通用型引物 LCO-1490/HCO-2198 获得甘蓝粉虱及其他常见粉虱的 COI 序列，根据测序结果设计种特异性 SS-COI 引物 1 对（APZYJF/APZYJR），其扩增片段大小为 384 bp，同时对该对引物的种特异性及灵敏性进行检测。【结果】种特异性检验结果显示，该对引物仅对甘蓝粉虱的 mtDNA COI 基因具有扩增效果，对我国常见的其他种类的粉虱包括温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum*（Westwood）、柑橘粉虱 *Dialeurodes citri*（Ashmead）、螺旋粉虱 *Aleurodicus disperses*（Russell）、双钩巢粉虱 *Paraleyrodes pseudonaranjae* Martin、非洲伯粉虱 *Bemisia afer*（Priesner *et* Hosny）以及烟粉虱 *B. tabaci*（Gennadius）5 个隐种（MED, Asia I, Asia II 1, Asia II 3 和 China 1）等不具有交叉反应扩增能力。灵敏性检验结果显示，该对引物不仅对不同性别的成虫具有良好的扩增效能，对 2 – 4 龄若虫甚至单粒卵或单头初孵若虫亦具有同样的扩增能力，其最低检测阈值为 14.00 ± 0.37 pg/μL（相当于 1/25 600 头雌性成虫）。【结论】该技术体系完全可用于甘蓝粉虱的快速准确识别及检测监测，对有效阻截其进一步扩张蔓延意义重大。

关键词：甘蓝粉虱；隐种；种特异性 SS-COI 引物；快速鉴定；分子检测
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2015)05-0579-08

Rapid identification of *Aleyrodes proletella* (Hemiptera: Aleyrodidae), a new invasive whitefly species in mainland China, based on SS-COI marker

CHEN Miao-Miao[1], GUO Rong[3], ZHANG Jin-Liang[4], WAN Fang-Hao[1,2,5], YANG Jin[1], ZHANG Gui-Fen[1,2,*] (1. State Key Laboratory for the Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Center for Management of Invasive Alien Species, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China; 3. National Agro-Technical Extension and Service Centre, Beijing 100026, China; 4. Beijing Plant Protection Station, Beijing 100029, China; 5. College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China)

Abstract: 【Aim】Morphological identification of *Aleyrodes proletella* (L.) is limited by small size, high degree of similarity to related species and polymorphism. This study aims to develop a technique based on mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I (mtDNA COI) gene sequence for the rapid identification of *A. proletella*, an invasive species newly found in mainland China. 【Methods】The fragments of mtDNA COI gene of *A. proletella* and ten other whitefly species or cryptic species were amplified and sequenced using COI gene universal primers LCO-1490/HCO-2198. One pair of species-specific COI (SS-COI) primers, APZYJF and APZYJR, was designed. The target fragment amplified by the SS-COI primers (APZYJF/APZYJR) is 384 bp in length. The species specificity and sensitivity of

基金项目：公益性行业（农业）科研专项（201103026, 201303019）；国家“973”计划项目（2009CB119200）
作者简介：陈苗苗，女，1988 年 10 月生，山东济宁人，硕士研究生，研究方向为入侵生物学，E-mail: chenmiaomiao_2012@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangguifen@caas.cn
收稿日期 Received: 2015-01-11；接受日期 Accepted: 2015-03-06

the primer pair were tested. 【Results】The species specificity of the primer pair was validated using ten other whitefly species and cryptic species, *i. e.*, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood), *Dialeurodes citri* (Ashmead), *Aleurodicus disperses* (Russell), *Paraleyrodes pseudonaranjae* Martin, *Bemisia afer* (Priesner *et* Hosny), and five cryptic species of *B. tabaci* (Gennadius) (MED, Asia I, Asia II 1, Asia II 3 and China 1). All *A. proletella* specimens were successfully detected, and no cross reaction with other whitefly species or cryptic species was observed. The method was tested using individual male or female adult, individual 2nd instar, 3rd instar or red-eyed nymph, and even one grain of egg or single newly emerged 1st instar nymph, and proved to be applicable for all of these life stages. Sensitivity test results demonstrated that successful amplification could be obtained with the concentration of template DNA as low as 14.00 ± 0.37 pg/μL, equal to 1/25 600 of a whole female adult of *A. proletella*. 【Conclusion】The SS-COI method developed here provides a quick, simple and reliable molecular technique for the identification and monitoring of *A. proletella*, which would be useful in intercepting and blocking the further spreading of this new invasive whitefly species.

Key words: *Aleyrodes proletella*; cryptic species; SS-COI primers; rapid identification; molecular detection

甘蓝粉虱 *Aleyrodes proletella* (L.)又称芸苔粉虱,属半翅目(Hemiptera),粉虱科(Aleyrodidae),粉虱属 *Aleyrodes*,是新入侵我国大陆的一种重要害虫(张桂芬等, 2014)。甘蓝粉虱原产于英国南部(Hill, 1987),目前已广泛分布于除南极洲以外各大洲的 30 多个国家和地区(Dale *et al*., 1976; Mound and Halsey, 1978; Hill, 1987; Nakahara and Hilburn, 1989; De Barro and Carver, 1997; Ko *et al*., 1998; Nappo, 2001)。甘蓝粉虱为多食性害虫,其寄主包括十字花科、菊科、毛茛科、伞形科、玄参科、桔梗科、凤仙花科、小檗科、大戟科、壳斗科、豆科和罂粟科等 12 科 40 种(属)植物(Mound and Halsey, 1978; Hill, 1987; 张桂芬等, 2014),但尤为嗜食十字花科和菊科植物(Hill, 1994),是欧洲十字花科蔬菜的主要害虫(Patti and Rapisarda, 1981; Hill, 1987)。而且,随着甘蓝粉虱入侵区域的逐渐扩大和定殖时间的推移,其寄主植物种类有进一步增加的趋势(Martin, 2010)。甘蓝粉虱一年发生 4 ~ 5 代,夏季完成一代约需 30 d(Hill, 1987),以成虫和若虫进行为害,为害方式有两种:一是直接刺吸寄主植物汁液,造成寄主营养不良,严重影响作物产量和质量;二是分泌蜜露诱发煤污病,不仅影响作物光合作用导致减产,还会影响作物品质和观赏植物的观赏价值。而有关其是否传播植物病毒,尚不得而知(Martin, 2010)。

甘蓝粉虱体型微小,寄主植物种类繁多且有极强的适生性,除借助风力自主飞行扩散外,还可以随植物材料借助交通工具进行远距离传播,目前已成功入侵新西兰(Dale *et al*., 1976)、百慕大(Nakahara and Hilburn, 1989)、美国(Nappo, 2001)、澳大利亚(De Barro and Carver, 1997)、中国台湾(Ko *et al*., 1998)等地。我国大陆于 2012 年 7 月在北京市首次发现甘蓝粉虱,翌年 8 月又在新疆发现,而且成虫和各龄若虫均严重发生(张桂芬等, 2014)。因此,甘蓝粉虱的快速准确识别是有效阻截其进一步传播扩散的首要前提。目前,国际上用于甘蓝粉虱鉴定的方法主要是形态特征识别法。然而,甘蓝粉虱的卵长约 0.2 mm,拟蛹体长不足 1 mm,成虫体长约 1.5 mm(Hill, 1987)。显然,传统的形态学鉴定法难以满足口岸检疫以及植物材料调运过程中对入侵生物进行快速准确识别的需要,尤其是当样本为幼体或残体时。因此,建立一套快速准确的分子检测技术,以满足植物检疫和害虫检测监测的现实需求,势在必行。

本研究围绕甘蓝粉虱极易随植物材料的调运而远距离传播扩散,对农业生产造成巨大威胁却难以快速准确识别的问题,采用基于线粒体 DNA 细胞色素 C 氧化酶亚基 I (mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I, mtDNA COI) 基因的种特异性(species-specific COI, SS-COI) PCR 技术,研究建立甘蓝粉虱的快速检测技术体系。研究结果对有效阻截甘蓝粉虱的进一步传播扩散及其扩张趋势监测具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

本研究中所使用的粉虱具体采集信息如表 1 所

示。所有标本浸泡于无水乙醇(分析纯,99.7%)中,于 -20℃保存备用。所有试虫经形态鉴定(由河南农业大学植物保护学院闫凤鸣教授协助完成)后用于相关研究。

表 1　用于本研究的粉虱种类采集信息

Table 1　Collecting data of whitefly (Aleyrodidae) species used in this research

序号 No.	种类 Species	寄主植物 Host plant	采集地点 Locality	采集日期 Collecting date
1	甘蓝粉虱 *Aleyrodes proletella* (L.)	生菜 *Lactuca sativa* L.	新疆乌鲁木齐 Urumqi, Xinjiang	2013-08-02
2	螺旋粉虱 *Aleurodicus disperses* (Russell)	番石榴 *Psidium guajava* L.	海南海口 Haikou, Hainan	2012-11-15
3	温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)	南瓜 *Cucurbita moschata* Duch.	新疆乌鲁木齐 Urumqi, Xinjiang	2013-07-30
4	柑橘粉虱 *Dialeurodes citri* (Ashmead)	柑橘 *Citrus reticulata* Blanco	湖北松滋 Songzi, Hubei	2012-09-11
5	非洲伯粉虱 *Bemisia afer* (Priesner *et* Hosny)	香椿 *Toona sinensis* (A. Juss.) Roem.	河南新乡 Xinxiang, Henan	2014-06-24
6	双钩巢粉虱 *Paraleyrodes pseudonaranjae* Martin	荔枝 *Litchi chinensis* Sonn.	海南海口 Haikou, Hainan	2012-11-17
7	烟粉虱 MED 隐种 *Bemisia tabaci* (Gennadius) MED	甘蓝 *Brassica oleracea* L.	广东广州 Guangzhou, Guangdong	2013-11-12
8	烟粉虱 Asia I 隐种 *B. tabaci* Asia I	棉花 *Gossypium hirsutum* L.	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	2013-07-30
9	烟粉虱 Asia II 1 隐种 *B. tabaci* Asia II 1	棉花 *G. hirsutum*	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	2013-07-30
10	烟粉虱 Asia II 3 隐种 *B. tabaci* Asia II 3	棉花 *G. hirsutum*	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	2013-07-30
11	烟粉虱 China 1 隐种 *B. tabaci* China 1	棉花 *G. hirsutum*	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	2013-07-30

1.2　DNA 提取

粉虱类昆虫 DNA 的提取参照李小凤等(2014)的方法,并稍加改进。用软毛毛笔挑取单头粉虱,置于滴有 20 μL DNA 提取缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,20 mmol/L NaCl,1% SDS,pH 8.0)的 Parafilm 膜上,以 0.2 mL 的 PCR 管底部作为匀浆器将烟粉虱充分研磨匀浆,将匀浆液吸入1.5 mL 离心管中;用 200 μL DNA 提取缓冲液分 4 次冲洗匀浆器和 Parafilm 膜,将缓冲液吸入同一离心管中;向管中加入 5 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL),涡旋混匀后,置于水浴锅中 60℃水浴 1 h(中途混匀 1 次),100℃沸水浴 5 min;加入 220 μL 氯仿/异戊醇(24∶1, v/v),轻轻混匀数十次后,冰浴 10 min;以 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液;加入 440 μL 预冷无水乙醇,轻轻混匀后,于 -20℃放置 30 min 左右;取出后,于 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min,小心弃去上清液;再加入 440 μL 预冷 75% 乙醇洗涤,于 4℃ 12 000 r/min 离心 15 min,小心弃去上清液;将离心管倒扣于洁净滤纸上,自然干燥 20 min 后,每管加入 50 μL 超纯水复溶,于 -40℃保存备用。

1.3　COI 基因 5′端序列的扩增

以甘蓝粉虱及其他 10 种/隐种(包括双钩巢粉虱、温室粉虱、柑橘粉虱、非洲伯粉虱、螺旋粉虱及烟粉虱 MED, Asia I, Asia II 1, Asia II 3 和 China 1 隐种)常见粉虱类害虫的 DNA 为模板,采用 mtDNA COI 基因通用型引物 LCO-1490 (5′-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3′) 与 HCO-2198 (5′-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3′) (Folmer *et al.*, 1994) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 30 μL,其中模板 DNA 2 μL,10 × Buffer(含 Mg^{2+})3 μL,dNTPs (10 mmol/L) 0.6 μL,上游引物和下游引物(10 μmol/L)各 0.6 μL,*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/μL)0.4 μL,超纯水 22.8 μL。PCR 反应条件为:94℃预变性 10 min;94℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。扩增反应在 Bio-Rad T100 Thermal Cycler 基因扩增仪(美国 Bio-Rad 公司出产)上运行。

取 5 μL PCR 扩增产物,加 2 μL 6 × 上样缓冲液,以 DNA Marker DL2000 为参照,在含有染色剂 GoldView(0.5 μg/mL)的 1.0% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离(电泳液为 0.5 × TAE)45 min(电压 85V)

后,以 GelDoc Universal Hood II 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司出产)分析结果。电泳检测分析质量合格的 PCR 产物,直接送北京三博远志生物技术有限公司进行双向测序。

1.4 甘蓝粉虱特异性 SS-COI 引物的设计

根据甘蓝粉虱、螺旋粉虱、温室粉虱、柑橘粉虱、非洲伯粉虱、双钩巢粉虱,以及烟粉虱 MED、Asia I、Asia II 1、Asia II 3、China 1 隐种 mtDNA COI 基因的测序结果(GenBank 登录号分别为: GLFS. 2013. 830000. 5. 1, LXFS. 2012. 666100. 5. 1, WSFS. 2012. 100018. 5. 4, GJFS. 2011. 350003. 5. 4, FZXFS. 2012. 100086. 5. 1, SGCFS. 2012. 570100. 5. 4, YFSQ. 2012. 100039. 5. 4, YFSAI. 2012. 674800. 5. 3, YFSZ2. 2006. 310058. 5. 2, YFSZ1. 2006. 310058. 5. 1, YFSZ3. 2012. 421000. 5. 1;中国外来入侵物种数据库 www. chinaias. cn),运用软件 Oligo 7 进行比对分析,选取甘蓝粉虱与其他种类粉虱 COI 基因序列差异较大的区域设计甘蓝粉虱特异性 SS-COI 引物一对(APZYJF/APZYJR),上游引物 APZYJF 的碱基序列为 5′-CAGCTTTATAATGTATTGGTCACA-3′,下游引物 APZYJR 的碱基序列为 5′-CTCAAATTTTATACCCAACAAA-3′(由上海生工生物工程技术服务有限公司协助合成)。

1.5 甘蓝粉虱 SS-COI 引物的种特异性检测

分别以温室粉虱、柑橘粉虱、螺旋粉虱、双钩巢粉虱、非洲伯粉虱以及烟粉虱 5 个隐种(MED, Asia I, Asia II 1, Asia II 3 和 China 1)的单头成虫 DNA 为模板,以甘蓝粉虱为阳性对照,检验甘蓝粉虱 SS-COI 引物 APZYJF/APZYJR 的种特异性。PCR 反应体系为 20 μL,其中模板 DNA 2.0 μL,10× Buffer(含 Mg^{2+})2.0 μL,dNTPs(10 mmol/L)0.3 μL,*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/μL)0.2 μL,上游引物和下游引物(10 μmol/L)各 0.3 μL,超纯水 14.9 μL。PCR 反应条件为:94℃预变性 10 min;94℃ 30 s,52℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。扩增产物的检测方法同 1.3 节。每种粉虱分别检测 7 头。

1.6 甘蓝粉虱 SS-COI 引物的灵敏性检测

以不同性别(单头雌性成虫、雄性成虫)和不同虫态[单粒卵,单头 1 龄若虫、2 龄若虫、3 龄若虫、4 龄若虫(拟蛹)]的甘蓝粉虱 DNA 为模板,进行灵敏性检验。此外,取单头雌性成虫原模板 DNA 溶液(358.40 ± 9.35 ng/μL)2 μL,以 2 倍递减梯度稀释至 7.00 ± 0.18 pg/μL;然后,以不同浓度的 DNA 溶液,即 14.34×10^3, 7.17×10^3, 3.58×10^3, 1.79×10^3, 896.00, 448.00, 224.00, 112.00, 56.00, 28.00, 14.00 和 7.00 pg/μL(相当于 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1 600, 1/3 200, 1/6 400, 1/12 800, 1/25 600 和 1/51 200 头雌成虫),为模板测定其检测阈值。每种性别、虫态及每个梯度分别检测 8 头。

2 结果

2.1 粉虱类昆虫 COI 基因 5′端序列的扩增及 SS-COI 标记分析

以甘蓝粉虱及其他 10 种/隐种(包括双钩巢粉虱、温室粉虱、柑橘粉虱、非洲伯粉虱、螺旋粉虱和烟粉虱 MED, Asia I, Asia II 1, Asia II 3, China 1 隐种)常见的粉虱类害虫 DNA 为模板,以 mtDNA COI 基因通用型引物 LCO-1490/HCO-2198 进行 PCR 扩增。电泳检测结果显示,11 种/隐种粉虱均能扩增出一条清晰的靶标片段(图 1);然后,将经电泳检测验证合格的 PCR 产物进行双向测序,结果显示,该片段长度约为 710 bp。根据测序结果设计甘蓝粉虱特异性 SS-COI 引物 1 对(APZYJF/APZYJR),其扩增片段大小为 384 bp(图 2)。

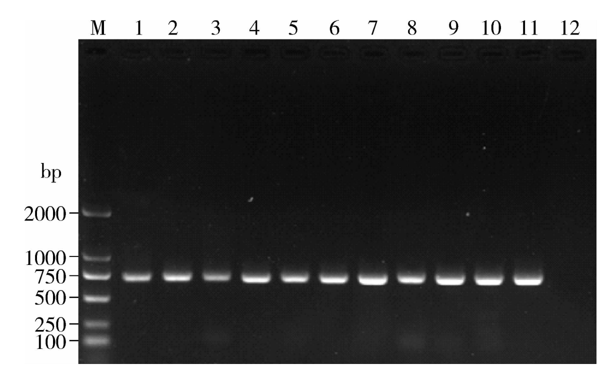


图 1 COI 基因通用型引物 LCO-1490/HCO-2198 对甘蓝粉虱及其他 10 种/隐种田间常见粉虱线粒体 DNA 的扩增效果

Fig. 1 PCR amplification of mitochondrial DNA of *Aleyrodes proletella* and ten other whitefly species or cryptic species common in the field using COI gene universal primers LCO-1490/HCO-2198

M: DNA 分子量标准 DNA marker; 1: 甘蓝粉虱 *Aleyrodes proletella*; 2: 双钩巢粉虱 *Paraleyrodes pseudonaranjae*; 3: 螺旋粉虱 *Aleurodicus dispersus*; 4: 温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum*; 5: 柑橘粉虱 *Dialeurodes citri*; 6: 非洲伯粉虱 *Bemisia afer*; 7: 烟粉虱 Asia I 隐种 *B. tabaci* Asia I; 8: 烟粉虱 Asia II 1 隐种 *B. tabaci* Asia II 1; 9: 烟粉虱 Asia II 3 隐种 *B. tabaci* Asia II 3; 10: 烟粉虱 China 1 隐种 *B. tabaci* China 1; 11: 烟粉虱 MED 隐种 *B. tabaci* MED; 12: 阴性对照(超纯水)Negative control (ultra-pure water).

2.2　甘蓝粉虱 SS-COI 引物的种特异性及灵敏性检验

以甘蓝粉虱及其他 10 种/隐种常见的粉虱类害虫 DNA 为模板，以所设计的甘蓝粉虱特异性 SS-COI 引物 APZYJF/APZYJR 进行 PCR 扩增。电泳检测结果显示，该对特异性 SS-COI 引物只对甘蓝粉虱具有扩增能力，对其他 10 种/隐种粉虱不具有扩增效果，表明该对引物为甘蓝粉虱的特异性引物（图 2）。

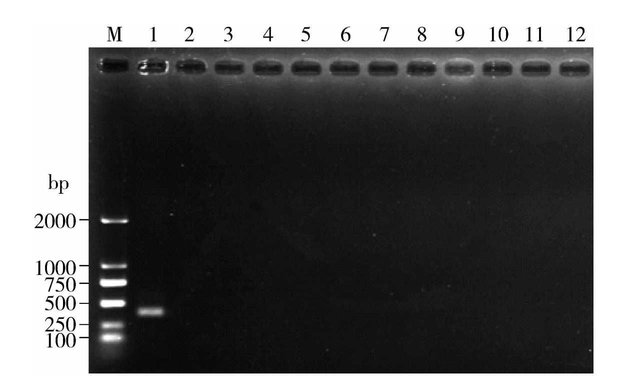


图 2　种特异性 SS-COI 引物 APZYJF/APZYJR 对甘蓝粉虱及其他 10 种/隐种粉虱线粒体 DNA 的扩增效果

Fig. 2　Amplification pattern of mitochondrial DNA of *Aleyrodes proletella* and ten other whitefly species or cryptic species using the species-specific SS-COI primers APZYJF/APZYJR

M：DNA 分子量标准 DNA marker；1：甘蓝粉虱 *Aleyrodes proletella*；2：双钩巢粉虱 *Paraleyrodes pseudonaranjae*；3：螺旋粉虱 *Aleurodicus dispersus*；4：温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum*；5：柑橘粉虱 *Dialeurodes citri*；6：非洲伯粉虱 *Bemisia afer*；7：烟粉虱 Asia I 隐种 *B. tabaci* Asia I；8：烟粉虱 Asia II 1 隐种 *B. tabaci* Asia II 1；9：烟粉虱 Asia II 3 隐种 *B. tabaci* Asia II 3；10：烟粉虱 China 1 隐种 *B. tabaci* China 1；11：烟粉虱 MED 隐种 *B. tabaci* MED；12：阴性对照（超纯水）Negative control (ultra-pure water).

以不同性别和不同虫态的甘蓝粉虱 DNA 为模板，以所设计的甘蓝粉虱特异性 SS-COI 引物 APZYJF/APZYJR 进行 PCR 扩增。电泳检测结果显示，不同性别、不同虫态的甘蓝粉虱均能稳定地扩增出 384 bp 的特异性片段（图 3）。

2.3　SS-COI 引物对甘蓝粉虱检测阈值的测定

当将单头雌性成虫的 DNA 模板以 2 倍递减梯度稀释至 14.00 pg/μL（相当于 1/25 600 头）时，所有个体均可扩增出特异性的靶标片段；当稀释至 7.00 pg/μL（相当于 1/51 200 头）时，仍有 50% 的个体可以扩增出微弱的靶标片段（图 4）。表明该对引物具有较高的灵敏性，其检测阈值为 14.00 pg/μL。

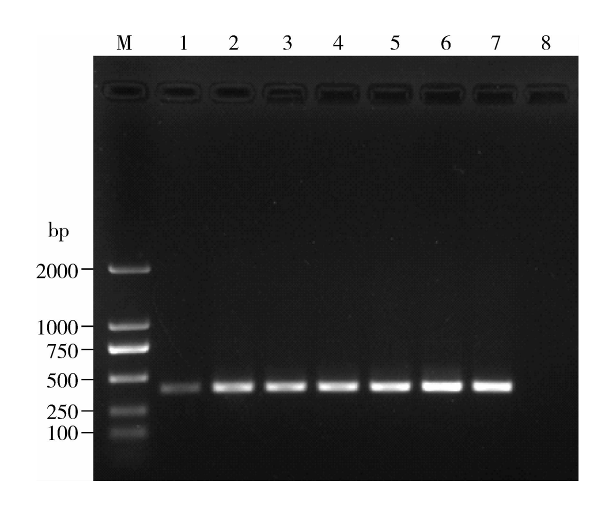


图 3　SS-COI 引物 APZYJF/APZYJR 对不同虫态和性别甘蓝粉虱的线粒体 DNA 的扩增效果

Fig. 3　Amplification pattern of mitochondrial DNA from different developmental stages and sexes of *Aleyrodes proletella* using SS-COI primers APZYJF/APZYJR

M：DNA 分子量标准 DNA marker；1：卵 Egg；2：1 龄若虫 1st instar nymph；3：2 龄若虫 2nd instar nymph；4：3 龄若虫 3rd instar nymph；5：4 龄若虫（拟蛹）4th instar nymph (red-eyed nymph)；6：雌性成虫 Female adult；7：雄性成虫 Male adult；8：阴性对照（超纯水）Negative control (ultra-pure water).

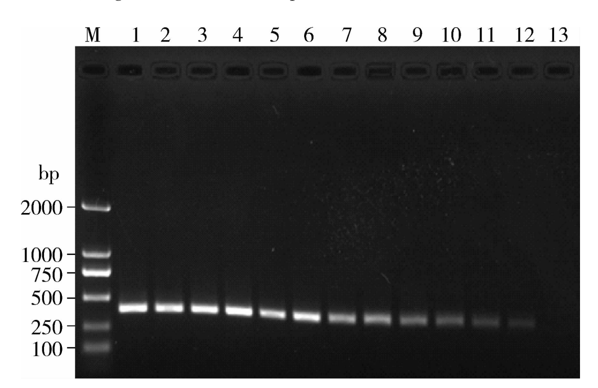


图 4　SS-COI 引物 APZYJF/APZYJR 对甘蓝粉虱线粒体 DNA 的检测阈值

Fig. 4　Detection threshold for diluted mitochondrial DNA samples of female adults of *Aleyrodes proletella* using SS-COI primers APZYJF/APZYJR

M：DNA 分子量标准 DNA marker；1－12：14.34×10^3，7.17×10^3，3.58×10^3，1.79×10^3，896.00，448.00，224.00，112.00，56.00，28.00，14.00，7.00 pg/μL（相当于 1/25，1/50，1/100，1/200，1/400，1/800，1/1 600，1/3 200，1/6 400，1/12 800，1/25 600 和 1/51 200 头雌成虫）Dilutions of 14.34×10^3，7.17×10^3，3.58×10^3，1.79×10^3，896.00，448.00，224.00，112.00，56.00，28.00，14.00，7.00 pg/μL，equal to 1/25，1/50，1/100，1/200，1/400，1/800，1/1 600，1/3 200，1/6 400，1/12 800，1/25 600 and 1/51 200 of a whole female adult，respectively；13：阴性对照（超纯水）Negative control (ultra-pure water).

3 讨论

粉虱类昆虫是世界性害虫,已知种类 1 550 余种,隶属 161 属(Martin and Mound, 2007),其中包含多种入侵性粉虱。而甘蓝粉虱是自 1994 年在上海发现烟粉虱 MEAM1 隐种(B 型)(陈连根, 1997),2003 年在云南昆明发现烟粉虱 MED 隐种(Q 型)(褚栋等, 2005),2006 年在海南发现螺旋粉虱(虞国跃等, 2007),2007 年在海南和广西发现双钩巢粉虱(虞国跃等, 2010),在海南发现小巢粉虱 *Paraleyrodes minei* Iaccarino(2007 -2012 年)(朱文静和符悦冠, 2013; 虞国跃等, 2014)等之后的又一入侵我国大陆的粉虱类害虫(张桂芬等, 2014)。

甘蓝粉虱个体微小,易随寄主植物的远距离运输而传播扩散,传统的形态学鉴定无法满足快速识别和有效阻截的基本需求,尤其是对甘蓝粉虱的卵和 1 -3 龄若虫。本研究采用基于 mtDNA COI 基因的 SS-COI 标记技术,研发出了甘蓝粉虱特异性引物 APZYJF/APZYJR 及其快速检测方法。该对引物特异性强,仅对甘蓝粉虱具有扩增效果,对田间常见的其他种类的粉虱如温室粉虱、柑橘粉虱、螺旋粉虱、双钩巢粉虱、非洲伯粉虱以及不同的烟粉虱隐种(MED, Asia I, Asia II 1, Asia II 3, China 1 隐种)不具扩增能力。同时,该技术体系具有较高的灵敏性,不仅对甘蓝粉虱雌雄性成虫具有良好的扩增效果,而且对 2 -3 龄若虫、拟蛹(4 龄若虫)甚至单粒卵或单头初孵若虫亦具有同样的扩增能力。此外,数据库同源性比对分析结果显示,没有任何一种同属(*Aleyrodes*)近缘种粉虱(如 *Aleyrodes shizuokensis* Kuwana)或其他种类的粉虱或昆虫的 DNA 序列与甘蓝粉虱特有的 384 bp 片段完全一致(序列一致性 ≤91%),表明该检测技术体系完全可以用于口岸检疫以及蔬菜和观赏植物等种苗和植株调运中对甘蓝粉虱的检测及其种群扩张趋势监测。

种特异性 PCR (species-specific PCR, SS-PCR)是根据已知 DNA 序列信息设计种特异性引物对靶标物种的特征片段进行扩增,从而达到物种识别的分子技术,该技术的关键是依据 DNA 序列存在足够大的种间变异和相对保守的种内变异来设计一对靶标物种的特异引物(Darling and Blum, 2007)。如,序列特异扩增区域(sequence characterized amplified regions, SCAR)标记技术就是由随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)标记转化而来的一种 SS-PCR 技术,其基本原理是将 RAPD 标记片段从凝胶上回收后进行克隆和测序,根据测序结果设计一对特异引物对基因组 DNA 进行再扩增,从而得到物种特异的 DNA 片段(Paran and Michelmore, 1993)。SCAR 标记因其反应条件严谨、结果稳定、重复性强、灵敏度高等优点,已成功应用于外来入侵害虫的快速检测鉴定,包括温室粉虱(Agustí *et al.*, 2000; 王金娜等, 2012)、烟粉虱(臧连生等, 2006; Ko *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007)、黑刺粉虱 *Aleurocanthus spiniferus* (Quaintance)(刘循等, 2009)等粉虱类害虫,以及西花蓟马 *Frankliniella occidentalis* (Pergande)(孟祥钦等, 2010)、光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky)(Kethidi *et al.*, 2003)等入侵害虫。然而,当 DNA 序列相似或多拷贝、存在 DNA 甲基化现象、回收片段中存在相同大小片段或存在邻近 DNA 片段污染等情况时,SCAR 标记有可能会转化失败(孙保娟等,2010),而 SS-COI 标记技术可以解决上述问题。

多拷贝的 mtDNA COI 基因是已知线粒体基因组 13 个蛋白质编码基因之一,该基因在保证足够变异的同时又很容易被通用型引物扩增,其 DNA 序列很少存在插入和缺失,而且拥有更多的系统发育信号(Hebert *et al.*, 2003)。SS-COI 检测技术是在 mtDNA COI 基因序列分析基础上发展起来的一种种特异性 PCR 检测技术,具有快速简便、省时经济且可靠性强、灵敏度更高等优点(Zhang *et al.*, 2012),目前已在西花蓟马(周力兵等, 2007; Zhang *et al.*, 2012)、美洲斑潜蝇 *Liriomyza sativae* Blanchard (张桂芬等, 2012)、双钩巢粉虱(张桂芬等, 2013a)、番茄潜叶蛾 *Tuta absoluta* (Meyrick)(张桂芬等, 2013b)、扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* Tinsley(田虎等, 2013)、番石榴果实蝇 *Bactrocera correcta* (Bezzi)(余道坚等, 2004; Jiang *et al.*, 2013)、枣实蝇 *Carpomyia vesuviana* Costa(程晓甜等, 2013)等潜在和突发性入侵害虫的识别鉴定中得到了广泛应用,并将在外来入侵物种的监测检测和有效阻截中发挥巨大作用。

本研究研发的甘蓝粉虱特异性 SS-COI 引物 APZYJF/APZYJR 及其快速检测技术体系是对甘蓝粉虱形态学鉴定识别方法的补充和改进,提高了检测的准确性和灵敏度,节约了检测时间,在甘蓝粉虱检测监测中具有很高的应用价值。然而,由于粉虱科昆虫种类较多,一些常见种类本研究未曾涉及,因

此该对 SS-COI 引物的特异性尚有待进一步验证。

致谢 河南农业大学植物保护学院闫凤鸣教授协助完成甘蓝粉虱标本鉴定，浙江大学昆虫科学研究所刘银泉教授提供烟粉虱隐种标本，特表感谢。

参考文献（References）

Agustí N, De Vicente MC, Gabarra R, 2000. Developing SCAR markers to study predation on *Trialeurodes vaporariorum*. *Insect Molecular Biology*, 9(3): 263–268.

Chen LG, 1997. The damage and morphological variations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) on ornamental plants. *Journal of Shanghai Agricultural College*, 15(3): 186–189. [陈连根, 1997. 烟粉虱在园林植物上为害及其形态变异. 上海农学院学报, 15(3): 186–189]

Cheng XT, Shataer A, Zhang W, Wen JB, Li XQ, Chen M, 2013. Species-specific PCR primers for identification of *Carpomyia vesuviana*. *Scientia Silvae Sinicae*, 49(11): 98–102. [程晓甜, 阿地力·沙塔尔, 张伟, 温俊宝, 李新泉, 陈梦, 2013. 枣实蝇特异引物 PCR 鉴定技术. 林业科学, 49(11): 98–102]

Chu D, Zhang YJ, Cong B, Xu BY, Wu QJ, 2005. Identification for Yunnan Q-biotype *Bemisia tabaci* population. *Chinese Bulletin of Entomology*, 42(1): 54–56. [褚栋, 张友军, 丛斌, 徐宝云, 吴青君, 2005. 云南 Q 型烟粉虱种群的鉴定. 昆虫知识, 42(1): 54–56]

Dale PS, Hayes JC, Johannesson J, 1976. New records of plant pests in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 19(2): 265–269.

Darling JA, Blum MJ, 2007. DNA-based methods for monitoring invasive species: a review and prospectus. *Biological Invasions*, 9(7): 751–765.

De Barro PJ, Carver M, 1997. Cabbage whitefly, *Aleyrodes proletella* (L.) (Hemiptera: Aleyrodidae), newly discovered in Australia. *Australian Journal of Entomology*, 36(3): 255–256.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294–299.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1512): 313–321.

Hill DS, 1987. Agricultural Insect Pests of Temperate Regions and Their Control. Cambridge University Press, Cambridge.

Hill DS, 1994. Agricultural Entomology. Timber Press, Portland.

Jiang F, Li ZH, Deng YL, Wu JJ, Liu RS, Buahom N, 2013. Rapid diagnosis of the economically important fruit fly, *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) based on a species-specific barcoding cytochrome oxidase I marker. *Bulletin of Entomological Research*, 103(3): 363–371.

Kethidi DR, Roden DB, Ladd TR, Krell PJ, Retnakaran A, Feng Q, 2003. Development of SCAR markers for the DNA-based detection of the Asian long-horned beetle, *Anoplophora glabripennis* (Motschulsky). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 52(4): 193–204.

Ko CC, Chou LY, Wu WJ, 1998. Aleyrodidae of Taiwan (Homoptera) Part IV. Unrecorded species. *Entomological Science*, 1(1): 77–79.

Ko CC, Hung YC, Wang CH, 2007. Sequence characterized amplified region markers for identifying biotypes of *Bemisia tabaci* (Hem. Aleyrodidae). *Journal of Applied Entomology*, 131(8): 542–547.

Li XF, Tian H, Zhang JL, Zhang GF, Chen MM, Wan FH, 2014. Identification of common whitefly species (Hemiptera: Aleyrodidae) in China based on the 5′- and 3′-end sequences of the COI gene. *Acta Entomologica Sinica*, 57(4): 466–476. [李小凤, 田虎, 张金良, 张桂芬, 陈苗苗, 万方浩, 2014. 基于 COI 基因 5′端与 3′端序列田间常见粉虱的分子鉴定. 昆虫学报, 57(4): 466–476]

Liu X, Wan FH, Zhang GF, 2009. SCAR marker for rapid detection of the spiny whitefly, *Aleurocanthus spiniferus* (Quaintance) (Homoptera: Aleyrodidae). *Acta Entomologica Sinica*, 52(8): 895–900. [刘循, 万方浩, 张桂芬, 2009. 可用于黑刺粉虱快速鉴定的 SCAR 分子标记技术. 昆虫学报, 52(8): 895–900]

Martin JH, Mound LA, 2007. An annotated check list of the world's whiteflies (Insecta: Hemiptera: Aleyrodidae). *Zootaxa*, 1492: 1–84.

Martin NA, 2010. Cabbage whitefly – *Aleyrodes proletella*. http://nzacfactsheets.landcareresearch.co.nz/factsheet/OrganismProfile/Cabbage_whitefly_-_Aleyrodes_proletella.html#3#3 (available on 30/12/2014).

Meng XQ, Min L, Wan FH, Zhou ZS, Wang WK, Zhang GF, 2010. SCAR marker for rapid identification of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *Acta Entomologica Sinica*, 53(3): 323–330. [孟祥钦, 闵亮, 万方浩, 周忠实, 王文凯, 张桂芬, 2010. 西花蓟马的 SCAR 分子检测技术. 昆虫学报, 53(3): 323–330]

Mound LA, Halsey SH, 1978. Whitefly of the World. A Systematic Catalogue of the *Aleyrodidae* (Homoptera) with Host Plant and Natural Enemy Data. John Wiley and Sons, Chichester.

Nakahara S, Hilburn DJ, 1989. Annotated checklist of the whiteflies (Homoptera: Aleyrodidae) of Bermuda. *Journal of the New York Entomological Society*, 97(3): 261–264.

Nappo, 2001. NPAG data: *Aleyrodes proletella* – brassica whitefly. http://www.pestalert.org/storage/Aproletella NAPPO.pdf (available on 3/3/2015).

Paran I, Michelmore RW, 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85(8): 985–993.

Patti I, Rapisarda C, 1981. Findings on the morphology and biology of aleyrodids injurious to cultivated plants in Italy. *Bollettino di Zoologia Agraria e di Bachicoltura*, 16: 135–190.

Sun BJ, Li ZL, Li ZX, Luo SB, Li YY, 2010. Reasons for SCAR conversion failure and its remedies. *Molecular Plant Breeding*, 8(3): 589–594. [孙保娟, 李植良, 黎振兴, 罗少波, 李艳艳,

2010. SCAR 标记转化失败的原因和对策. 分子植物育种, 8(3): 589 - 594]

Tian H, Li XF, Wan FH, Zhang GF, Zhang JL, 2013. Identification of *Phenacoccus solenopsis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae) with species-specific COI (SS-COI) primers. *Acta Entomologica Sinica*, 56(6): 689 - 696. [田虎, 李小凤, 万方浩, 张桂芬, 张金良, 2013. 利用种特异性 COI 引物(SS-COI)鉴别扶桑绵粉蚧. 昆虫学报, 56(6): 689 - 696]

Wang JN, Wang XJ, Zhang YJ, Wang SL, 2012. Establishment and application of SCAR marker for rapid identification of *Trialeurodes vaporariorum*. *Journal of Environmental Entomology*, 34(3): 295 - 301. [王金娜, 王相晶, 张友军, 王少丽, 2012. 温室白粉虱 SCAR 分子鉴定技术的建立及应用. 环境昆虫学报, 34(3): 295 - 301]

Yu DJ, Deng ZP, Chen ZL, Jiao Y, Zhang GM, Kang L, Yang WD, Jin XZ, 2004. Method of the polymerase chain reaction for quarantine and identification of *Bactrocera correcta*. *Plant Quarantine*, 18(2): 73 - 76. [余道坚, 邓中平, 陈志粦, 焦懿, 章桂明, 康林, 杨伟东, 金显忠, 2004. PCR 法检疫鉴定番石榴实蝇. 植物检疫, 18(2): 73 - 76]

Yu GY, Fu YG, Xian ZH, 2010. An alien whitefly, *Paraleyrodes pseudonaranjae* Martin, found in Hainan and Guangxi, China. *Journal of Environmental Entomology*, 32(2): 275 - 279. [虞国跃, 符悦冠, 贤振华, 2010. 海南、广西发现外来双钩巢粉虱. 环境昆虫学报, 32(2): 275 - 279]

Yu GY, Peng ZQ, Wen HB, Fu YG, 2014. Identification of an alien whitefly, *Paraleyrodes minei* Iaccarino and its host plants. *Journal of Environmental Entomology*, 36(3): 455 - 458. [虞国跃, 彭正强, 温海波, 符悦冠, 2014. 外来种小巢粉虱 *Paraleyrodes minei* 的识别及寄主植物. 环境昆虫学报, 36(3): 455 - 458]

Yu GY, Zhang GL, Peng ZQ, Liu K, Fu YG, 2007. The spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus*, invaded Hainan Island of China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(3): 428 - 431. [虞国跃, 张国良, 彭正强, 刘奎, 符悦冠, 2007. 螺旋粉虱入侵我国海南. 昆虫知识, 44(3): 428 - 431]

Zang LS, Jiang T, Xu J, Liu SS, Zhang YJ, 2006. SCAR molecular markers of the B biotype and two non-B populations of the whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 14(2): 208 - 212. [臧连生, 江彤, 徐婧, 刘树生, 张友军, 2006. 烟粉虱 B 型及二个非 B 型种群的 SCAR 分子标记. 农业生物技术学报, 14(2): 208 - 212]

Zhang GF, Guo JY, Wang R, Yang T, Li XF, Guo JY, Cao FQ, Zhang JL, Wan FH, 2013a. Species-specific COI primers to assist the molecular identification of the invasive whitefly, *Paraleyrodes pseudonaranjae*. *Journal of Biosafety*, 22(3): 157 - 162. [张桂芬, 郭建洋, 王瑞, 杨婷, 李小凤, 郭建英, 曹凤勤, 张金良, 万方浩, 2013a. 双钩巢粉虱的种特异性 SS-COI 检测技术. 生物安全学报, 22(3): 157 - 162]

Zhang GF, Liu WX, Guo JY, Lü ZC, Wan FH, Shen XJ, 2012. Species-specific PCR primers for identification of *Liriomyza sativae* Blanchard. *Journal of Biosafety*, 21(1): 74 - 78. [张桂芬, 刘万学, 郭建英, 吕志创, 万方浩, 申香菊, 2012. 美洲斑潜蝇 SS-PCR 检测技术研究. 生物安全学报, 21(1): 74 - 78]

Zhang GF, Liu WX, Guo JY, Zhang YB, Wan FH, 2013b. Species-specific COI primers for rapid identification of *Tuta absoluta* (Meyrick), a significant, potential alien species. *Journal of Biosafety*, 22(2): 80 - 85. [张桂芬, 刘万学, 郭建洋, 张毅波, 万方浩, 2013b. 重大潜在入侵害虫番茄潜叶蛾的 SS-COI 快速检测技术. 生物安全学报, 22(2): 80 - 85]

Zhang GF, Lü ZC, Wan FH, 2007. Detection of *Bemisia tabaci* remains in predator guts using a sequence-characterized amplified region marker. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 123(1): 81 - 90.

Zhang GF, Meng XQ, Min L, Qiao WN, Wan FH, 2012. Rapid diagnosis of the invasive species, *Frankliniella occidentalis* (Pergande): a species-specific *COI* marker. *Journal of Applied Entomology*, 136(6): 410 - 420.

Zhang GF, Xian XQ, Zhang JL, Li XF, Ma DY, Wan FH, 2014. Cabbage whitefly, *Aleyrodes proletella* (L.) (Hemiptera: Aleyrodidae), invaded mainland China. *Journal of Biosafety*, 23(1): 66 - 70. [张桂芬, 冼晓青, 张金良, 李小凤, 马德英, 万方浩, 2014. 甘蓝粉虱入侵中国大陆. 生物安全学报, 23(1): 66 - 70]

Zhou LB, Liu ZS, Li CY, Ding YM, 2007. Method of the polymerase chain reaction for identification of *Frankliniella occidentalis*. *Plant Quarantine*, 21(2): 78 - 81. [周力兵, 刘忠善, 李春艳, 丁元明, 2007. PCR 法鉴定西花蓟马. 植物检疫, 21(2): 78 - 81]

Zhu WJ, Fu YG, 2013. The *Aleyrodidae* (Hemiptera, Sternorrhyncha) of Hainan Island, China. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 38(3): 647 - 656. [朱文静, 符悦冠, 2013. 海南岛粉虱科昆虫种类及中国四新纪录种记述(半翅目, 胸喙亚目). 动物分类学报, 38(3): 647 - 656]

(责任编辑: 袁德成)